

DialogWeb

Command Search

new search

databases

alerts

order

cost

logout

help

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

☒ Select All☒ Clear Selections

Print/Save Selected

Send Results

Format

Display Selected

Short

1. ☐ 1/7/1**06711265 ANTI-MCP-1 ANTIBODY RECOGNIZING PEPTIDE MIMICS, THEIR PRODUCTION AND USE THEREOF**

Pub. No.: 2000-297098 [JP 2000297098 A]

Published: October 24, 2000 (20001024)

Inventor: SUGIMURA KAZUHISA

Applicant: WELFIDE CORP

Application No.: 11-105896 [JP 99105896]

Filed: April 13, 1999 (19990413)

ABSTRACT

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce peptide mimics capable of controlling and regulating the interaction of MCP-1 regarded as closely participating in the migration of a monocyte with an receptor thereof.

SOLUTION: The peptide mimics are capable of controlling and regulating the interaction of MCP-1 closely participating in the migration of a monocyte with a receptor thereof. The pharmaceutical composition and a monocyte migration inhibitor comprise the peptide mimics. The method for producing the peptide mimics comprises screening a phage random peptide library with an anti- MCP-1 antibody. The peptide mimics are useful as a monocyte migration inhibitor and can be expected for supply to various inflammatory diseases.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

JAPIO (Dialog® File 347): (c) 2005 JPO & JAPIO. All rights reserved.

☒ Select All☒ Clear Selections

Print/Save Selected

Send Results

Display Selected

Format

Short

© 2005 Dialog, a Thomson business

Command

Submit

Previous

AC

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-297098

(P2000-297098A)

(43) 公開日 平成12年10月24日 (2000. 10. 24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)	
C 0 7 K 7/08		C 0 7 K 7/08		4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/00	6 0 9	A 6 1 K 31/00	6 0 9 G	4 B 0 6 4
	6 2 9		6 2 9	4 B 0 6 5
			6 2 9 A	4 C 0 8 4
	6 3 5		6 3 5	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平11-105896

(22) 出願日 平成11年4月13日 (1999. 4. 13)

(71) 出願人 000006725

ウェルファイド株式会社

大阪府大阪市中央区平野町 2 丁目 6 番 9 号

(72) 発明者 杉村 和久

鹿児島市皇徳寺台 5 丁目 20 番 5 号

(74) 代理人 100080791

弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗MCP-1 抗体認識ペプチドミックス、その製造方法およびその用途

(57) 【要約】

【解決手段】 単球の遊走に密接に関与している MCP-1 の、その受容体との相互作用を制御・調節することが可能なペプチドミックス、当該ペプチドミックスを有効成分とする医薬組成物、単球遊走阻害剤。抗 MCP-1 抗体を用いてファージランダムペプチドライブラリーをスクリーニングすることを含む当該ペプチドミックスの製造方法。

【効果】 単球の遊走に密接に関与していると考えられる MCP-1 と、その受容体との相互作用を制御・調節することが可能な本発明のペプチドミックスは、単球遊走阻害剤として有用であり、各種炎症性疾患へ提供が期待できる。

ージのジーン3遺伝子部分の塩基配列解析を行って、相互作用部位を決定する方法である。

【0006】この方法を用いて、抗p53モノクローナル抗体によるp53分子上のエピトープの決定（ただし、p53と相溶性が高い）、抗bEGF抗体によりスクリーニングされたbEGF類似体がbFGFとその受容体FGFR-1の結合を阻害したこと、あるいは抗アセチルコリン受容体エピトープ抗体と結合するペプチド配列の発見（当該受容体とは相溶性がないが、アセチルコリンと結合するか否かは言及せず）等が報告されている（J. Mol. Biol., 248, p58~78, 1995年発行。Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 10638~42および10643~47, 1993年発行）。

【0007】また、この手法をさらに発展させて、CTLA-4に関して、抗CTLA-4モノクローナル抗体を用いて、当該抗体が結合する標的分子の立体構造をアミノ酸の一次配列に依存せずに模倣する分子であり、且つ受容体ーリガンドの相互作用を制御できるような分子を得る方法も報告されている（ネイチャー・バイオテクノロジー、16巻、267~270頁、1998年発行。）

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、単球の遊走活性に密接に関連しているMCP-1の、受容体との相互作用を制御・調節することが可能なペプチドミックスを提供することを目的とする。さらに本発明は当該ペプチドミックスの単球遊走阻害剤としての利用を目的とする

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の事情を考慮して、さらに研究を行った結果、抗MCP-1抗体と結合し、かつMCP-1の単球遊走活性に対する阻害効果を有するファージクローンを単離することに成功した。さらに、抗MCP-1抗体と結合するMCP-1様ペプチドミックスを同定し、本発明を完成した。本発明は抗MCP-1抗体と結合するMCP-1様ペプチドミックス、当該ペプチドミックスとジーン3蛋白質との融合体、当該ペプチドミックスの単球遊走阻害剤としての用途、および抗MCP-1抗体を用いてファージランダムペプチドライブラリーをスクリーニングすることにより当該ペプチドミックスを得る方法に関する。

【0010】すなわち本発明は以下の通りである。

- 1) 抗MCP-1抗体と結合し得るMCP-1様ペプチドミックス。
- 2) MCP-1のアミノ酸配列とは相溶性がない上記1)記載のMCP-1様ペプチドミックス。
- 3) MCP-1と立体構造が類似している、および／またはMCP-1とその受容体との相互作用を制御・調節

する上記1)または2)記載のMCP-1様ペプチドミックス。

4) 15残基のアミノ酸配列を有するポリペプチドである上記1)記載のMCP-1様ペプチドミックス。

5) 以下の(1)または(2)のアミノ酸配列を有するポリペプチドである上記1)記載のMCP-1様ペプチドミックス。

(1) RPLPPRFGCVPLGCL (配列表配列番号3)

(2) NSGSLCGFSVPWYSC (配列表配列番号4)

(Rはアルギニンを、Pはプロリンを、Lはロイシンを、Fはフェニルアラニンを、Gはグリシンを、Cはシステインを、Vはバリンを、Nはアスパラギンを、Sはセリンを、Iはイソロイシンを、Wはトリプトファンを、Yはチロシンをそれぞれ示す。)

6) 上記1)~5)のいずれかに記載のMCP-1様ペプチドミックスとジーン3蛋白質との融合体。

7) 上記1)~5)のいずれかに記載のMCP-1様ペプチドミックス、あるいは上記6)記載のMCP-1様ペプチドミックスとジーン3蛋白質との融合体を有効成分として含有する医薬組成物。

8) 上記1)~5)のいずれかに記載のMCP-1様ペプチドミックス、あるいは上記6)記載のMCP-1様ペプチドミックスとジーン3蛋白質との融合体を有効成分として含有する単球遊走阻害剤。

10) 抗MCP-1抗体を用いて、ファージランダムペプチドライブラリーをスクリーニングし、当該抗MCP-1抗体と結合し得るMCP-1様ペプチドミックスを発見しているファージクローンを単離することを含む、抗MCP-1抗体と結合し得るMCP-1様ペプチドミックスの製造方法。

【0011】

【発明の実施の態様】本発明において抗MCP-1抗体と結合するMCP-1様ペプチドミックスとは、抗MCP-1抗体と結合する、MCP-1と立体構造が非常によく類似している、MCP-1のアミノ酸配列とは相溶性がほとんどない、MCP-1とその受容体との相互作用を制御・調節する、等の特徴を有するものである。全体では少なくとも8個のアミノ酸を有する分子であり、好ましくは15個のアミノ酸からなるペプチドミックスが例示される。

【0012】本発明のMCP-1様ペプチドミックスの具体例としては、RPLPPRFGCVPLGCL

(配列表配列番号3；以下、当該アミノ酸配列からなるペプチドミックスを、後述する由来ファージクローンに基づいてC27ミックスともいう)、NSGSLCGFSVPWYSC (配列表配列番号4；以下、当該アミノ酸配列からなるペプチドミックスを、後述する由来ファージクローンに基づいてG25ミックスともい

10

20

30

40

50

る。通常、このようにして得られたファージクローンは、抗体との結合力の差や保持されているアミノ酸配列の種類によって、いくつかのクローン集団に分類することができる。得られたファージクローンの遺伝子の塩基配列解析はジデオキシ法等の常法により簡単に行うことができる。

【0022】本発明のMCP-1様ペプチドミックスは、その微細な受容体結合様式の違いにより、また、MCP-1とその受容体の系に関与する分子の発現状態により、MCP-1に対して正の制御または負の制御を行うことができる。特に炎症性疾患時のようにMCP-1-受容体系が異常亢進している場合には負の制御を行うことができる。故にMCP-1活性阻害剤あるいは単球遊走阻害剤として、また、慢性関節リウマチ、肺線維症、腎炎等の慢性炎症性疾患、アテローム、動脈硬化症、悪性腫瘍等の予防および治療に対して有用である。

【0023】本発明の医薬組成物ならびに単球遊走阻害剤は、有効成分である本発明のMCP-1様ペプチドミックス、あるいはジーン3蛋白質と当該MCP-1様ペプチドミックスとの融合体を、必要に応じて適宜の医薬的に許容される添加剤（例えば、担体、賦形剤、希釈剤等）等の製薬上必要な成分と混合し、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤等の態様にて経口的に、また注射剤等の態様にて非経口的に投与することができる。投与量は有効成分の種類（ペプチドミックスの種類）、投与ルート、患者の病状および疾患の種類、体重、年齢、性別等に応じて適宜増減できるが、一般的には成人1日当たりペプチドミックスの量で0.001~1000mgを、1日1回乃至数回に分けて投与するのが望ましい。

【0024】

【実施例】本発明をより詳細に説明するために実施例および実験例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

実施例1

(1) ファージ・ディスプレイ・ライブラリーおよびパンニング

ファージランダムペプチドディスプレイライブラリーの構築およびマイクロパンニングは福本らの報告（ネイチャー・バイオテクノロジー、16巻、278~270頁、1998年発行）に準じて行った。fd-tetファージの改変体であるfUSE5ベクター中のジーン3蛋白質（以下、G3Pとも呼称。このものはリーダー配列を切断して成熟型として存在する。）のN末から5番目の位置に15残基のランダムなアミノ酸配列からなるペプチド分子を挿入した。種々のランダムペプチド分子をその表面に発現する各種ファージをライブラリーとして構築した。

【0025】続いて、抗ヒトMCP-1モノクローナル抗体（M279、E11、F9）を用いて、ファージランダムペプチドライブラリーのパンニングを行った。当

該抗MCP-1抗体はファージを選択するための鋳型として使用した。ライブラリーをスクリーニングして、抗MCP-1抗体に結合するファージクローンを単離した。

【0026】各種抗MCP-1抗体をそれぞれ35mmのプラスチックプレート（岩城ガラス社製）に10μgコーティングしたものに、先で調製したファージライブラリー〔5×10¹² Transducing Unit（以下、TU）〕とを4℃で16時間反応させた（パンニング）。未結合のファージを0.5%トウイン20を含むトリス塩酸緩衝生理食塩液（TBS；50mMトリス塩酸、0.15M塩化ナトリウム含有、pH7.5）で洗浄後に、0.1N塩酸-グリシン緩衝液（pH2.2）を用いて、各種抗MCP-1抗体と結合したファージを溶出した。回収後に1Mトリス塩酸（pH9.1）で中和した。得られたファージを大腸菌K91kan（ネイチャー・バイオテクノロジー、16巻、267~270頁、1998年発行。）に感染・増殖させた。パンニングに用いる各種抗MCP-1抗体量を5μg、1μgと減らしながら同じ操作を繰り返し、より強く特異的に抗MCP-1抗体と結合するファージクローンを選別した。

【0027】得られた約100個のファージクローンについてELISA法による一次スクリーニングを行った。ELISA用プレート（住友ベークライト社製）に各種抗MCP-1抗体100ng/40μl/穴を用いて4℃で一晩コーティングした。1%BSA（ウシ血清アルブミン、シグマ社製）を含むTBS100μlを用いて室温で2時間ブロッキングした。0.5%トウイン20を含むTBSでプレートを洗浄し、各種ファージクローン2×10¹⁰ピリオン/40μl/穴およびビオチン化抗M13モノクローナル抗体（ファルマシア社製）40ng/40μl/穴を添加した。1000分の1に希釈したアルカリホスファターゼ（AP）標識ストレプトアビジン（ベクターラボ社製）を室温で1時間反応させ、洗浄後に基質であるp-ニトロフェニルリン酸ナトリウム6水和物（和光純薬）を添加し、405nmにおける吸光度を測定した。7個のクローンが抗MCP-1抗体と特異的に結合した。

【0028】さらに、抗MCP-1抗体と特異的に結合した7個のファージクローンについて、それぞれのG3P体（すなわち各ペプチドミックスとジーン3蛋白質との融合体）を福本らの報告（上記）に準じて精製した。

【0029】(2) パンニングにより選択したファージに挿入されているDNAの配列解析
ジーン3蛋白質に組み込まれた各種ペプチドミックスのDNA配列をDNAシーケンサー（Applied Biosystems社製の373A-36S型）を用いて解析した。プライマーとして以下の塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドを用いた。

10

20

30

40

50

をDiff-Quikで染色し、顕微鏡で遊走細胞を数えた。結果を表3に示す。

【0037】

【表3】

ファージクローン	添加濃度 (ビリオン/ml)	遊走細胞数
C27ファージ	1×10^6	59
	1×10^7	33
	1×10^8	52
	1×10^9	6
	1×10^{10}	0
G25ファージ	1×10^6	63
	1×10^7	57
	1×10^8	0
	1×10^9	0

【0038】C27ファージ、G25ファージはPBM Cの遊走、すなわち、単球の遊走を阻害することが判明した。

【0039】

【発明の効果】本発明のMCP-1様ペプチドミックスは、単球の遊走に密接に関与しているMCP-1の、20 受容体との相互作用を制御・調節することが可能であり、単球遊走阻害剤として有用である。炎症反応におけるMCP-1の作用を考えると、本発明のMCP-1様ペプチドミックスは、各種炎症性の疾患に適用可能である。

【0040】

【配列表フリーテキスト】配列表配列番号2：シーケンシングプライマーとして作用するよう設計されたオリゴヌクレオチド。

配列表配列番号3：抗MCP-1抗体によって認識されるペプチド。

配列表配列番号4：抗MCP-1抗体によって認識されるペプチド。

【0041】

【配列表】

SPECIMEN SEQUENCE LISTING

<110> Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.
 <120> PEPTIDE MIMICS RECOGNIZED WITH ANTI-MCP-1 ANTIBODY, METHOD FOR PRODUCTION THEREOF AND USE THEREOF
 <130> A3939
 <160> 4
 <210> 1
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> bacteriophage (fd-tet)
 <400> 1
 Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser
 -15 -10 -5
 His Ser Ala Asp Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Glu Thr Val Glu Ser
 1 5 10
 Cys Leu Ala Lys Pro His Thr Glu Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys
 15 20 25 30
 Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr Ala Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp
 35 40 45
 Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys Thr Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr
 50 55 60
 Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu Ala Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly
 65 70 75
 Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly
 80 85 90

<212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Peptide recognized with anti-MCP-1 antibody.
 <400> 3
 Arg Pro Leu Pro Pro Arg Phe Gly Cys Val Pro Leu Gly Cys Leu
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Peptide recognized with anti-MCP-1 antibody.
 <400> 4
 Asn Ser Gly Ser Ile Cys Gly Phe Ser Val Pro Trp Tyr Ser Cys
 1 5 10 15

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	タームコード (参考)
A 6 1 K 31/00	6 3 7	A 6 1 K 31/00	6 3 7 E
38/00		C 0 7 K 14/00	
C 0 7 K 14/00		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 7/00	
// C 1 2 N 7/00		A 6 1 K 37/02	
15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 DA20 GA11
 HA04
 4B064 AG01 CA12 CC24 DA01
 4B065 AA98X AB01 BA02 CA24
 CA44
 4C084 AA02 AA07 AA18 BA01 BA08
 BA18 BA41 CA56 NA14 ZA452
 ZA592 ZB112 ZB152 ZB262
 ZC412
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA15 BA16
 BA17 BA41 CA01 DA01 DA86
 EA22 FA74